

博士論文審査結果の要旨

学位申請者 細 川 俊 浩

主論文 1 編

Robust circadian rhythm and parathyroid hormone-induced resetting during hypertrophic differentiation in ATDC5 chondroprogenitor cells.

Acta Histochemica et Cytochemica 48;65-171,2015

審 査 結 果 の 要 旨

概日時計はさまざまな生理機能における約 24 時間周期のリズムを形成する。軟骨にも概日時計が存在しており、軟骨分化に影響を与えていると考えられている。しかし、軟骨分化における概日時計の役割や軟骨分化による概日時計への影響は不明である。また、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone : PTH) はマウス大腿骨関節軟骨における概日リズムの位相を変位させることが判明している。しかし、軟骨細胞レベルにおける PTH の概日リズムへの影響は明らかでない。本研究の目的は、軟骨細胞の概日リズムをリアルタイムに測定可能な実験系を構築し、分化に伴う概日リズムの変化を評価することおよび PTH の概日リズムへの影響を検討することである。

申請者は、軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞を用い、Bmal1-luc レポーターを導入し ATDC5^{Bmal1-luc} 細胞を作製した。分化マーカーとしてⅡ型コラーゲン、アグリカン、Ⅹ型コラーゲンの遺伝子発現を real time RT-PCR 法で測定し、細胞外基質の産生をアルシアンブルー染色で評価した。発光リズムを分化誘導前後に発光測定装置を用いて計測した。また、分化誘導後 7 日に PTH (Human, 1-34) を加え、発光リズムの位相変位を解析した。

分化誘導後に分化マーカーの遺伝子発現は有意に増加し、アルシアンブルーで細胞外基質が染色された。ATDC5^{Bmal1-luc} 細胞の発光リズムは分化誘導後すべての分化段階において明瞭な概日リズムを示した。同調刺激後 41 時間に PTH を 10^{-10}M の濃度で加えた群では有意な位相変位を認めなかったが、 10^{-9}M , 10^{-8}M の濃度で加えた群では位相が後退した。同調刺激後 50 時間に 10^{-10}M の濃度で加えた群では有意な位相変位を認めなかったが、 10^{-9}M , 10^{-8}M の濃度で加えた群では位相が前進した。PTH を 10^{-8}M の濃度で同調刺激後 44 時間に加えた群では最大約 12 時間の位相変位を認めたが、同調刺激後 56 時間に加えた群では位相変位は生じなかった。

軟骨内骨化では軟骨細胞は前駆軟骨細胞から肥大軟骨細胞まで多段階の分化過程を経て骨に置換される。各分化段階における概日リズムの存在は不明であったが、本研究によって概日リズムがすべての分化段階で明瞭に存在することが明らかになった。PTH は軟骨細胞の概日リズムをリセットする強い同調因子であり、軟骨細胞の概日時計を制御している可能性があることを示した。

以上が本論文の要旨であるが、ATDC5 細胞はすべての分化段階において概日リズムを有しており、PTH は軟骨細胞の概日リズムにおける強い同調因子であること示した点で、医学的に価値ある研究と認める。

平成 28 年 11 月 17 日

審査委員 教授 松 田 修 ㊞

審査委員 教授 田 代 啓 ㊞

審査委員 教授 伊 東 恭 子 ㊞